

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-192196

(43) 公開日 平成5年(1993)8月3日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z	8114-4B		
C 0 7 H 21/04				
C 1 2 N 15/11				
// C 1 2 N 15/10				
		8931-4B	C 1 2 N 15/00	A
			審査請求 未請求 請求項の数2(全 6 頁)	

(21) 出願番号	特願平3-272528	(71) 出願人	000002130 住友電気工業株式会社 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号
(22) 出願日	平成3年(1991)10月21日	(72) 発明者	岸本 利彦 大阪府大阪市此花区島屋1丁目1番3号 住友電気工業株式会社大阪製作所内
(31) 優先権主張番号	特願平2-319169	(72) 発明者	丹羽 真一郎 大阪府大阪市此花区島屋1丁目1番3号 住友電気工業株式会社大阪製作所内
(32) 優先日	平2(1990)11月22日	(72) 発明者	中林 誠 大阪府大阪市此花区島屋1丁目1番3号 住友電気工業株式会社大阪製作所内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外1名)

(54) 【発明の名称】 一本鎖DNAを末端で支持体に固定化する方法

(57) 【要約】

【目的】 一本鎖DNAを末端で支持体に固定化する方法を提供する。

【構成】 一本鎖DNAと該一本鎖DNAの相補鎖とからなる二本鎖DNAを該一本鎖DNAの末端で支持体に結合させ、次いで変性処理により相補鎖を脱離せしめる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一本鎖DNAと該一本鎖DNAの相補鎖とからなる二本鎖DNAを該一本鎖DNAの末端で支持体に結合させ、次いで変性処理により相補鎖を脱離せしめることからなる、一本鎖DNAを末端で支持体に固定化する方法であって、固定化される一本鎖DNAは相補鎖に比べその末端に1若しくはそれ以上の余分のヌクレオチド分子を含んでいるか、あるいは固定化される一本鎖DNAの末端にあるヌクレオチド分子が化学的修飾を受けているものであり、該余分のヌクレオチドまたは化学的修飾を受けたヌクレオチドを介して支持体への結合が行われることを特徴とする方法。

【請求項2】 請求項1に記載の方法で得られる、末端で支持体に固定化された一本鎖DNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は分子生物学の分野に関し、詳しくは、一本鎖DNAを末端で支持体に固定化する方法に関する。一本鎖DNAを支持体に固定化したものは、mRNAを全RNAから精製する際に使用されるオリゴdTセルロース等のオリゴdTDNA結合粒子として、あるいは、サザンハイブリダイゼーション等ハイブリダイゼーション実験に用いるメンブレン上に非特異的に固定化した一本鎖に変性したDNA等として使用されている。かかる固定化一本鎖DNAは、従来、一本鎖DNAの末端ヌクレオチド分子を、そのアミノ基や水酸基又は化学的修飾により導入された官能基を介して支持体に結合させることにより製造されてきた。しかしながら、この従来法では、末端ヌクレオチド以外の分子に含まれるアミノ基や水酸基、あるいは導入された官能基までが反応に関与するため、末端ヌクレオチド分子のみを支持体に結合させることは不可能であった。従って、得られた固定化DNAは、一本鎖DNAが種々の部位で支持体に結合したものであり、その本来の目的を十分に効率よく達成し得ないものであった。

【0002】本発明者らは、一本鎖DNA分子に含まれるアミノ基や水酸基の反応性は、当該一本鎖DNAをその相補鎖とアニーリングすることにより封じ得ることに着目し、まず一本鎖DNAの末端ヌクレオチド分子を支持体との結合が可能な様に化学的に修飾し、これをその

相補鎖とアニーリングした上で支持体に結合させるか、あるいは二本鎖DNAの一方の鎖に1若しくはそれ以上のヌクレオチド分子が付加した形の二本鎖DNAをそのまま、あるいは付加した部分を化学的に修飾した後、該付加部分を介して支持体に結合させ、得られた固定化二本鎖DNAを変性処理すると、相補鎖は支持体に共有結合していないために固定化された一本鎖DNAから脱離し、従ってこれを分離除去すれば、末端で支持体に結合した固定化一本鎖DNAが得られることを見出し、本発明を完成したものである。

【0003】従って本発明の目的は、一本鎖DNAと該一本鎖DNAの相補鎖とからなる二本鎖DNAを末端で支持体に結合させ、次いで変性処理により相補鎖を脱離せしめることからなる、一本鎖DNAを末端で支持体に固定化する方法であって、該一本鎖DNAはその末端に1若しくはそれ以上の余分のヌクレオチド分子を含んでいるか、あるいは一本鎖DNAの末端にあるヌクレオチド分子が化学的修飾を受けているものであり、該余分のヌクレオチドまたは化学的修飾を受けたヌクレオチドを介して支持体への結合が行われることを特徴とする方法を提供するものである。本発明の別の目的は、かかる方法で得られる、末端で支持体に固定化された一本鎖DNAを提供するものである。以下、本発明に係る固定化法を順を追ってより詳細に説明する。

【0004】一本鎖DNAの末端を化学的に修飾する場合

1) まず、末端に固定化に適した官能基(例えば-NH₂、-COOHなど)を導入した一本鎖DNAを調製する。DNAを合成する場合、その合成自体は、市販のDNA合成装置(例えばABI社製391型PCR-MATEなど)を使用し、常法によって行うことができる。官能基の導入は、例えば次のような方法で行うことができる。

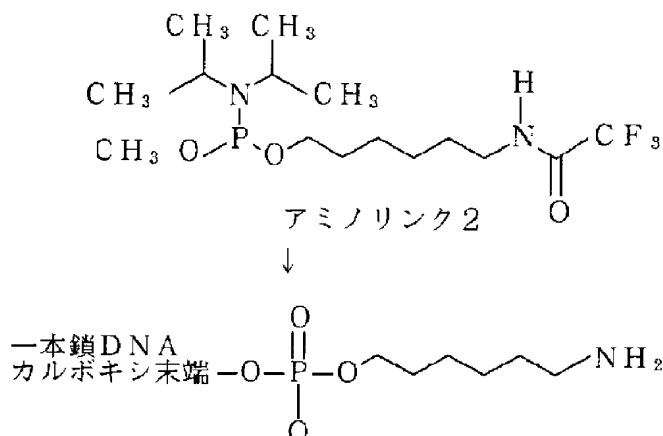
(1) アミノリンク2 (ABI社製) の導入

以下の反応式に従い、DNA合成装置を使って、ヘキシルアミノ基をDNA末端に導入することができる (Applied Biosystems Inc User Bulletin No. 49 August 1988、参照)。

【化1】

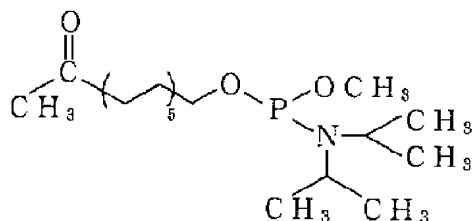
一本鎖DNAカルボキシ末端-OH

+



【0005】(2) 式:

【化2】



で示されるリンカーを、DNA合成装置（ABI社製、A-391EP PCR-MATEなど）を用いてDNA末端に導入し、これを適当に処理することにより、このリンカー末端を反応性のあるアルデヒド基またはカルボキシル基に導くことができ、更にアルデヒド基の場合は、ピオチンのヒドラシド化合物と反応させることにより、アビジンと複合体を形成し得るピオチンを導入することができる（Jonathan N. Kremskyら、Nucleic Acid Research 1987 vol.15, p2891～参照）。

(3) DNA合成装置を用い、アミノ基をもつ塩基のヌクレオチド1～数10個を相補部分のDNA末端に付加する。

(4) ターミナルトランスフェラーゼにより、支持体との結合に適した塩基、またはその反応性誘導体をDNA末端に導入する（Deug, G. and Wu, R. Methods in Enzymology vol. 100 p96-116, 1983, 参照）。

2) 次に、1)で得た一本鎖DNAの相補鎖を1)と同様合成装置を用いて調製し、両者をアニーリングさせる。

【0006】3) 上で得た二本鎖DNAに固定化用支持体を加え、適当な手段で両者を結合させる。支持体としては、例えば、ナイロン膜、ニトロセルロース膜、ポリテトラフルオロエチレン膜、ポリエチレン膜等、天然または合成有機高分子膜（膜状体）を挙げることができる。ニトロセ

ルロースのように有機高分子（例；セルロース）を化学的に処理し、改質して得た膜も含む。また、その他の支持体としては、グラファイト、多孔質ガラス、シリカ等の無機高分子膜、アルミニウム、アバタイト等の金属膜、アルミナ、窒化珪素等のセラミックス膜、食塩等の結晶を挙げることができる。さらに、これらの表面を化学的、物理的に表面処理することで改質されたものも使用できる。

【0007】さらに、ナイロン、ニトロセルロース、セルロース、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエチレン等の有機高分子の粒子；グラファイト、多孔質ガラス、シリカ等の無機高分子の粒子；アルミニウム、アバタイト等の金属粒子；アルミナ等のセラミック粒子；等も使用することができ、また、これら有機高分子を、例えば酸化、還元、加水分解などの化学的処理、例えばプラズマ照射などの物理的処理で改質したもの、無機高分子粒子、金属粒子、セラミック粒子を、例えばイオンブレイティングなどの物理的、化学的に表面処理を行うことで改質されたものも使用できる。この表面処理の仕方は、ポリメチルメタクリレート重合膜に強アルカリ溶液（4N NaOH）をかけ、数時間反応させて表面にカルボキシル基を導入する；ポリスチレン膜に紫外線照射を行い過酸化物を表面に生じさせ酸処理により水酸基を導入する；テフロンシートにナフタレニジナトリウム塩を作用させ、さらに過酸化水素を作用させて水酸基を導入する（Ind. Eng. Chem. Res 1989 Vol.28 No.7）；ポリウレタン膜に、アンモニアガス中でグロー放電することによりその表面にアミノ基を導入する、等がある。DNAと支持体との結合法は、DNAおよび支持体の両者の化学的修飾の種類によって異なり、次のいずれかの方法を用いることができる。

【0008】i) DNA又は担体上の水酸基（主としてジオール基）をトリフルオロエタンスルホンクロ

ライド (トレスクロライド) (K. Nillson and K. Mosbach: Biochem. Biophys. Res. Commun., 102, 449, 1981), CNBr (R. Axen, et al: Nature, 214, 1302, 1967), トリクロロトリアジン (T. H. Finlay, et al: Anal. Biochem., 87, 77, 1978), エピクロロヒドリン (I. Matsumoto, et al: J. Biochem., 85, 1091, 1979), ピスオキシラン (L. Sundberg and J. Porath: J. Chromatogr., 90, 87, 1974), ジピニルスルホン酸 (J. Porath: Meth. Enzymol., 34, 27, 1974), ペンゾキノロン (J. Brandt, et al: Biochem. Biophys. Acta, 386, 196, 1975), カルボニルジイミダゾール (G. S. Bethell, et al: J. Biol. Chem., 254, 2572, 1979) など活性化し、担体上、又はDNAの主としてアミノ基と結合させる。

【0009】 ii) DNA又は担体上の主としてカルボキシル基 (—COOH基) を水溶性カルボジイミド等のカルボジイミド (A. Tengblad: Biochem. J., 199, 297, 1981, M. Funabashi, et al: Anal. Biochem., 126, 414, 1982) 又は2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1, 2-ジヒドロキノリン (EEDQ) (G. Saccomani, et al: J. Biochem., 256, 12405, 1981, B. Belleau and G. Malek: J. Am. Chem. Soc., 90, 1651, 1968) で活性化し、担体上又はDNAの主としてアミノ基 (—NH₂) と縮合結合させる。

iii) 従来の非特異的又は末端とは限らない状態で支持体に結合したDNAに、所望のDNAをDNAリガーゼ (連結酵素) を用いて結合させる。

iv) 担体上及びDNAのヒドラジド基とアルデヒド基またはヒドラジド基とカルボキシル基を用いて結合させる。ヒドラジド基とアルデヒド基の場合は、混合するとヒドラゾン結合を形成する。これを還元操作を行うことで共有結合化する (Jonathan N. Kremsky: 上掲)。ヒドラジドとカルボキシル基の場合は、ii) のようにカルボジイミド等を用いる。

【0010】 v) DNA及び担体上に互いに親和力のあるものを導入し (例えばビオチンとアビジン等)、その親和力に基づいた固定化を行う (Jonathan N. Kremsky: 上掲)。

vi) DNAと担体上のチオール基同志を活性化、固定化する。 (K. Brocklehurst, et al: Biochem. J., 133, 573, 1973)。

vii) DNAと担体上のアミノ基同志をブリモアセタミド法にて結合させる (P. Cuatrecasas: J. Biol. Chem., 245, 3059, 1970)。

【0011】 4) 上で得た固定化二本鎖DNAを2.4 Mテトラエチルアンモニウムクロライド水溶液、適宜希釈した10×SSC (1.5 MのNaClおよび0.15 Mクエン酸ナトリウム; pH 7.0)、0.1~2 M NaCl水溶液等の塩溶液中、熱 (約40℃以上) またはアルカリを加えることにより変性させ、遠心して固相と液相を分離することにより、固定化一本鎖DNAを得る。

【0012】 二本鎖DNAをそのまま、あるいは末端を化学的に修飾して用いる場合

既述した様に、二本鎖DNAの一方の鎖に1若しくはそれ以上のヌクレオチド分子が付加した形の二本鎖DNAは、そのままあるいは化学的な修飾を施した後支持体に末端で結合させることができるので、上記の工程3)以降の操作を施せば、上と同様の目的を達成することができる。この様な二本鎖DNAは、次の様にして調整することができる。

【0013】 i) 一本鎖DNAの化学的修飾 (4) で述べた様に、ターミナルトランスフェラーゼを使用して、片方のDNA鎖の末端にのみ、支持体との結合に適した塩基またはその反応性誘導体を導入することができる。

ii) 末端に一本鎖部分ができる様に制限酵素で切断する。

iii) 官能基を持つDNA分子と、二本鎖DNAをDNAリガーゼにより結合させる。例えば、二本鎖DNAの両端の切断端が異なる配列を持つように2種の制限酵素で処理する。そこで一方の切断端に特異的に結合できる配列を有する官能基を有するDNAを加え、そこにDNAリガーゼを作用させることにより目的DNA断片の末端に官能基を導入できる。(この場合、除去したい方の鎖の5'末端を脱リン酸化しておいてもよい。即ち目的とする二本鎖DNAの一端だけが出た長い二本鎖DNAを調製し、この状態で脱リン酸化酵素により5'末端を脱リン酸化し、その後二本鎖DNAを切断して目的断片をつくと一方の5'末端は脱リン酸化されたものができる)。

【0014】 iv) 二本鎖DNAの3'末端—OH基にトリクロロトリアジン基を導入することでOH基を活性化する (5'末端—OH基にはiii) で述べた脱リン酸化を行い—OH基を露出させトリクロロトリアジンを反応させて活性化する。3'末端の—OH基と5'末端の—OH基では反応性が全く5'末端の方が良いため5'末端—OH基を特異的に活性化できる)。この場合、一方の鎖に1もしくはそれ以上のヌクレオチドが存在する必要はない。

【0015】 本発明方法により製造された固定化DNAは、一本鎖DNA分子が全て末端で支持体に結合したものであり、従って固定化によるDNAの塩基の破壊がないため液相中でのDNAの挙動とほぼ同じ挙動が期待でき、非常に精度の高いDNAのハイブリッド形成ができる。又具体的には、本発明の方法で固定化したDNAと従来法 (一本鎖DNAのまま) の固定化したDNAでは、ハイブリッド量が単位DNA当たり10倍以上違った。又、固定化したDNAは従来法ではDNA中の塩基がつぶれるためこの固定化DNAではDNA中に変異が生じたものと同じ結果となりDNA中の1塩基の変異を見分けるハイブリッド形成はできない。しかし本発明の方法では、ハイブリッドさせるDNA中の1塩基の変異も認

別が可能であった。これは、固定化したDNAの塩基が途中で壊れていないことを示している。以下に実施例を挙げるが本発明はこれに限定されるものではない。

【0016】実施例1

ABI社製DNA合成装置にて下記の配列のDNAを合成した。1 μ Mスケールで合成し、下記(1)の配列は1.8mg、(2)の配列は1.3mg精製後回収された。

(1) 5' X GTC TGG GAA AAA CCC CCT TTG AGT 3'

(2) 5' ACT CAA AGG GGG TTT TTC CCA GAC 3'

X: アミノリンク2 (ABI社製)

得られたDNAをそれぞれ業者指示の方法により精製した。(1)および(2)のDNAそれぞれ100 μ g分をとって減圧下で乾固する。(1)のDNA100 μ gを1M NaCl(100 μ l)に溶かし、乾固した(2)のDNA(100 μ g)と混合した。次いで0.4M NaHCO₃(pH 7.5)を100 μ l加えた。この溶液を95℃の水浴上で2分間あたため、20分かけて5℃に冷却した。これに、後に説明する方法で調製したトレシル活性化シリカゲル20mgを加え、室温で24時間反応させた。反応終了後、シリカゲルを1M NaClで3回洗浄し、最後

に、1M NaCl 1mlに懸濁した。これを95℃で5分間加温し、直ちに遠心し(12000 rpm)、上清を除去し、残渣として固定化DNAを得た。

【0017】この様にして得た固定化DNAの固定化量を分光光度計により、以下の要領で測定した。即ち、固定化量測定溶媒として飽和ショ糖溶液を用い、シリカゲル溶液の屈折率をあわせた上でスペクトルをとるとゲルによる散乱光の影響を極めて押えた上で正確な測定ができる。スペクトルのとり方は、分光光度計としてシマズのUV-200/型を用い、コントロールに5mg/200 μ lシリカゲル(shim pack diol)をとり、5mg/400 μ lシリカゲル(shim pack diol)によりベースライン補正後、同じく5mg/200 μ lのDNA固定化ゲルをサンプルとして測定したのが第1図であり、260nmにDNAに特異的な吸収があるのがわかる。この固定化量は260nmの吸収1に対して30 μ g/ml一本鎖DNAが対応するとして計算した。

$\Delta A_{260} = 0.45$ より13.5 μ g/ml(0.45×30 より)

ゲルは5mg/200 μ lより12.5mg/mlである。故に13.5 \div 12.5 \times 1000 = 1.08mg/g乾燥ゲルとなり、よって1gのゲルに1.08mgの一本鎖DNAが末端固定されたことがわかった。

【0018】トレシル活性化シリカゲルの調製

以下の操作は、水分を嫌うので、ドライボックスもしくは乾燥窒素を満した無菌バックなどを適宜利用し、なるべく水分の混入を防ぐことを念頭において行う。

1) アセトン、ピリジンをあらかじめモレキュラーシーブで脱水しておく。

2) 1mlの脱水アセトン、100 μ lのピリジン、およ

び小さなスターラーチップを10mlのメスフラスコに入れておく。

3) 1gのゲルをガラスフィルター(#5メッシュ)上でアスピレーターで吸収しながら、アセトン、脱水アセトンで素早く洗浄し、直ちに2)で用意したメスフラスコに入れる。

【0019】4) 乾燥窒素で外気が混入しないようにしながら、スターラーでゲルを激しく攪拌しつつ、100 ~ 200 μ lのトリフルオロエタンスルホンクロライド(Fluka製)を1分ほどかけて滴下する。この際、水を詰めたビニール袋などでフラスコを0℃付近に保っておく。

5) メスフラスコにふたをし、ゲルを破碎させないようにスターラーの速度を落し20分間反応させる。やはり0℃付近に保つ。

6) 反応後、ガラスフィルター上に移し、アセトン、アセトン+5mM HCl(1:1)、5mM HClで洗浄する。

7) さらにアセトンで洗浄し、フィルター上で十分アセトンをとばす。

8) ナスフラスコに移し、減圧下にアセトンをとばす。トレシルは高温では不安定なので、5)で用いた氷入りビニールなどで低温に保ちつつ乾燥させると、トレシル化シリカゲルが得られる。

【0020】実施例2

ABI社製DNA合成装置にて下記の配列のDNAを合成した。1 μ Mスケールで合成し、下記(1)の配列は1.2mg、(2)の配列は1.2mg精製後回収された。

(1) 5' X GTC TGG GAA AAA CCC CCT TTG AGT 3'

(2) 5' ACT CAA AGG GGG TTT TTC CCA GAC 3'

X: アミノリンク2 (ABI社製)

得られたDNAをそれぞれ業者指示の方法により精製した。(1)および(2)のDNAそれぞれ500 μ g分をとって減圧下で乾固する。(1)のDNA500 μ gを1M NaCl(100 μ l)に溶かし、乾固した(2)のDNA(500 μ g)と混合した。この溶液を95℃の水浴上で2分間あたため、60分かけて35℃に冷却した。これに、0.4M NaHCO₃(pH 7.5)100 μ lを加え、さらにTOSOH製トレシル5PWゲル20mgを加え、室温で24時間反応させた。反応終了後、ゲルを1M NaClで3回洗浄し、最後に、0.5M NaCl 1mlに懸濁した。これを95℃で5分間加温し、直ちに遠心し(12000 rpm)、上清を除去し、残渣として固定化DNAを得た。この除去した上清のDNAより固定化されたDNA量を算出したところ80 μ g/g \cdot dry \cdot gelのDNAが固定できた(上清の $A_{260} = 0.053$ 、 $A_{260} = 1$ が30 μ g/ml DNAとして計算した)。

【図面の簡単な説明】

【図1】 固定化一本鎖DNAのUVスペクトルを示すグラフである。

【図1】

